

A 2003-2006. közötti években elért tudományos eredmények összefoglalása

I. Az iszkémiás szívbetegség új altípusa: „slow coronary flow phenomenon”

A morfológiailag ép epikardiális koronáriákban észlelhető meglassult kontrasztanyag áramlasként definiált „slow coronary flow” (SCF) jelenséget éveken keresztül pusztán angiográfiás abnormalitásnak tartották. SCF betegek klinikai adatait, angiográfiás képeit és különböző markerek szérumszintjeit hasonlítottuk össze az iszkémiás szívbetegség (ISZB) különböző formáiban szenvedő betegek paramétereivel. A SCF betegekben az instabil angina gyakori klinikai megjelenése ellenére (32 %) az akut fázis fehérjék szintjei (IL-6, hs-CRP, vWF) hasonlóak voltak más, nem akut ISZB-ben szenvedő betegek csoportjaiban mért szintekhez. A sICAM-1 szintek magasabbak voltak valamennyi vizsgált klinikai csoportban az egészséges véradókhoz hasonlítva ($p < 0,005$), azonban karakterisztikusan alacsonyabbak voltak a SCF betegekben más ISZB-ben szenvedő alanyokhoz képest ($p < 0,05$), amely a SCF-ban egyidejűleg jelenlévő endothelialis diszfunkció és alacsony nyíróerő („shear stress”) hatását jelezheti. Ezért a SCF jelenség, amely az elvégzett koronarográfiás vizsgálatok 0,8%-ban diagnosztizálható, az iszkémiás szívbetegségeken belül egy független klinikai formát képvisel: egyedi klinikai képpel, egyedi angiográfiás jellemzőkkel és biokémiai szérumszint mintázattal.

II. Koronária áramlási sebesség és endothelialis diszfunkció kapcsolata

Cél a lokális koronária áramlási sebesség („corrected TIMI frame count”, CTFC) és az atherosclerosis során szerepet játszó szisztémás szérumszintű markerek (sICAM-1, IL-6, hs-CRP, vWF) közti összefüggés meghatározása volt. A következő betegpopulációkat vizsgáltuk: stabil iszkémiás szívbetegség ($n=96$), akut koronária szindróma ($n=27$) és dokumentált miokardiális iszkémia ellenére is negatív koronarográfiás eredmény ($n=68$). Az akut fázis fehérjék szintjének emelkedésén túl a betegcsoportok csupán marginális eltérést mutattak. Azonban egyénre lebontva és elemelve az eredményeket, pozitív korrelációt találtunk a CTFC és a sICAM szint között ($r=0.33$), mely akut koronária szindrómában volt a legerősebb ($r=0.61$), függetlenül több kardiovaszkuláris rizikófaktortól (nem, életkor, testtömeg index (BMI), dohányzás, hipertónia, diabétesz). A gyógyszeres kezelés, a hs-CRP, IL-6, vWF szintek nem befolyásolták a korrelációt. A fenti eredmények jelzik a koronária áramlási sebesség és a szisztémás adhéziós molekulatermelés közötti összefüggést.

III. Az endothel diszfunkció non-invazív diagnosztikája szöveti lézer-Doppler és arteriográf segítségével

A diabetes mellitus az akcelerált atherosclerosis egyik legfontosabb rizikófaktora, ezért ezen betegek segítségével – őket mikro és macroangiopathia szempontjából két klinikai csoportba osztva – az endothelialis diszfunkció vizsgálómódszerei kidolgozhatóak. Arteriographot és szöveti lézer-Dopplert alkalmaztunk 1-es típusú vagy 2-es típusú *diabetes mellitus* és egészséges kontroll csoportot összehasonlítva. Az arteriográf segítségével az érfal rugalmasságára jellemző ún. „augmentációs index”-et határoztuk meg. Méréseink alapján *diabetes mellitus* esetén mindkét alkalmazott módszer érzékenynek bizonyult az érrendszer kóros elváltozásainak kimutatására, így a két non-invazív módszer együttes alkalmazásával az endothel diszfunkció, mint a macro- és microangiopathia korai stádiuma kimutatható, a szövődmények szűrhetők.

IV. A keringő endothelsejtek („circulating endothelial cells”, CEC) izolálása és karakterizációja, az endothelialis dyszfunkció invazív vizsgálata kardiovaszkuláris betegekben

A vérben keringő endothelsejtek száma kardiovaszkuláris események alatt megemelkedik. Vizsgálataink során a CEC számát határoztuk meg akut miokardiális infarktusban közvetlenül a perkután koronária intervenció (PCI) előtt, után, 24 és 96 óra múlva (n=21). Emellett mértük a serum sICAM-1 és von Willebrand faktor szinteket. A pre-PCI mintákban a CEC száma szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest; a sejtszám 24 óra múlva érte el a legmagasabb szintet ($p=0,023$). Érdekes módon, ezzel párhuzamosan a sICAM-1 és vWF szintek csökkenő tendenciát mutattak. Pozitív korrelációt találtunk a CKMB PCI előtt mért szintje és a CEC 1. napos sejtszámok között ($r=0,52$). Összefoglalva, a vérben található magas CEC szám egyértelmű endothel károsodást bizonyít, és mértéke korrelációt mutat a szívizom károsodás mértékével, jelzi a kardiovaszkuláris rizikót. Az észlelt gyors vWF és sICAM-1 csökkenés jelentősége még tisztázásra vár.

V. A keringő endothelsejtek számát befolyásoló tényezők vizsgálata koronarográfiával igazolt stabil ischaemiás szívbetegekben

A keringő endothelsejtek száma az endothel sérülés egyik direkt markere. Fő célkitűzésünk a kardiovaszkuláris kockázati tényezők ill. a terápiás beavatkozások hatásának felmérése volt a CEC számra stabil anginában szenvedő betegekben (n=57). A CEC száma AP betegekben szignifikánsan magasabb volt az egészséges egyénekhez képest; hypertóniában, hyperlipidaemiában, diabetesben szenvedő, illetve dohányzó betegekben emelkedett CEC számot találtunk. A gyógyszeres kezelés hatásait illetően, a clopidogrellel (CLO) kezelt betegekben szignifikánsan alacsonyabb CEC számot találtunk. Regressziós analízist alkalmazva a kvalitatív változók közül csak a CLO szedése független prediktor paraméternek bizonyult ($p=0,029$). A statinnal kezelt betegekben hasonló endothel protektív tendencia volt megfigyelhető; a hatás mechanizmus felderítése további vizsgálatokat igényel.

VI/1. Poli-ADP-ribóz polimeráz-1 (PARP-1) aktiváció akut miokardiális iszkémia-reperfúzió állapotokban

A miokardiális iszchémiát/infarktust követő reperfúzió során DNS károsító reaktív szabadgyökök keletkeznek, melyek a PARP-1 enzim kóros aktivációjához vezetnek, kimerítve a sejt ATP és NAD^+ készleteit. Ez a mechanizmus adhatja a primer perkután koronária intervenció (PCI)-indukálta reperfúziós miokardium károsodás alapját. Ennek igazolására ST-elevációs akut miokardiális infarktus miatt primer PCI-on átesett betegek szérum peroxid koncentrációját ($[\text{H}_2\text{O}_2]$), keringő leukocitáiban a reaktív szabadgyökök hatását jelző tirozin-nitrozilációt és következményes PARP-1 aktivációt vizsgáltunk. A szérum $[\text{H}_2\text{O}_2]$ PCI előtt és után emelkedett volt, krónikus koronária betegek értékeihez hasonlítva. A leukociták immuncitokémiai analízise során enyhe tirozin-nitroziláció volt észlelhető PCI előtt, mely PCI után kifejezetté vált, és intenzitása a 4. napra sem csökkent. A PAR (poli-ADP-ribóz, a PARP-1 végterméke) festődés már a PCI előtt látható, közvetlenül a PCI után a legintenzívebb, majd a 4. napra jelentősen gyengül. A leukociták Western blot analízise során hasonló eredményeket kaptunk. A fentiek alapján az ST-elevációs miokardiális infarktus során már a PCI előtt oxidatív károsodás, következményes PARP-1 aktiváció alakul ki. Ezt a patológiás aktivációt a PCI során elért reperfúzió jelentős mértékben fokozza. A jövőben a primer PCI előtt alkalmazott gyógyszeres PARP-1 enzim gátlás, s ezzel a miokardiális sejtek reperfúziós oxidatív károsodásának megelőzése e betegcsoport terápiájának fontos része lehet.

VI/2. Ischaemiás szívbetegség különböző formáiban kialakuló DNS károsodás mérése Comet assay segítségével

Az oxidatív folyamatok és a velük párhuzamosan jelenlevő antioxidáns mechanizmusok által létrehozott egyensúly az atherosclerosis során megbomlik. Jelen vizsgálat célja koronáriabetegek (akut miokardiális infarktus primer perkután koronária intervencióval, stabil

angina pectoris és korban illesztett kontrollcsoport, n=22) DNS károsodásának összehasonlítása, az akut miokardiális infarktus kezelése során lezajló reperfúziós károsodás mértékének megítélése, illetve a rizikófaktorok szerepének tisztázása volt. A DNS törések mértéke jelzi a coronaria atherosclerosis súlyosságát; azonban miokardiális infarktuson átesett betegek PCI előtti PCI utáni értékei nem mutattak szignifikáns eltérést. A DNS törések mértéke egyértelmű összefüggést mutatott a diabetes mellitussal és a hypertóniával. Ezért a jövőben a DNS törés mértékének meghatározása az atherosclerotikus megbetegedések rizikóbecslésében szerepet kaphat.

VII. A patológiás thrombocyta funkció felmérése ischaemiás szívbetegségekből:

VII/1. Az ADP EC50 érték thrombocyta aggregometriával történő meghatározásának szerepe clopidogrel rezisztens betegek kiszűrésében

A P2Y₁₂ ADP receptor gátló clopidogrel antithrombocita hatásának mérésére az egyéni variabilitás miatt klinikai igény van. Habár a P2Y₁₂ receptor EC₅₀ értéke kísérletes rendszerekben az alacsony mikromoláris tartományban van, a legtöbb humán trombocita vizsgálat magas, akár 20 μM koncentrációjú ADP-t használt. Ezért cél az ADP EC₅₀ értékének meghatározása (Born aggregometria) volt elektív koronária intervencióra kerülő kardiovaszkuláris betegeken (n=72). Eredményeink alapján stabil koronária betegeken is alacsony mikromoláris tartományban van az ADP EC₅₀ értéke. Magas ADP koncentrációk használatával az aggregometria során túlbecsülik a terápiarezisztens egyének számát, ezért ajánljuk az ADP EC₅₀ értékének meghatározását. A clopidogrel rezisztens egyének magasabb CRP, sCD40L és vWF szintjei jelzik, hogy a clopidogrel hatását az aktív metabolit képződésének mértéke mellett befolyásolja a háttérben zajló atherosclerotikus gyulladási folyamat intenzitása is.

VII/2. A sztatinok és a P2Y₁₂ ADP receptor gátló clopidogrel közti gyógyszer-interakció vizsgálata perkután koronária intervencióra kerülő iszkémiás szívbetegségekből

A clopidogrel a CYP450 3A₄-es izoenzim által metabolizálódik, csakúgy mint két lipidcsökkentő gyógyszer, az atorvastatin és a simvastatin. Vizsgálataink célja a három gyógyszer közti kölcsönhatás kimutatása volt 48 stabil koronária-beteg ADP és kollagén indukálta trombocita aggregációjának mérésével. A 48 beteg közül a korábban sztatint szedő 20 beteg clopidogrel felírás mellett 40 mg simvastatint, 8 atorvastatint kapott; 20 beteg nem kapott sztatint. A clopidogrel bevétele után 4 órával mindhárom csoportban szignifikáns aggregáció csökkenés volt, az aggregáció gátlás mértékében a sztatin és a kontroll alcsoportok között nem volt szignifikáns különbség. A fentiek alapján a PCI kapcsán kötelezően adott felíró dózisú clopidogrel trombocita aggregáció gátló hatását a sztatin előkezelés nem befolyásolta hátrányosan, a clopidogrel és sztatinok interakciója klinikailag jelentéktelen. A tartós sztatin kezelés kedvezően befolyásolja a trombocita aggregációt, ami független a clopidogrel hatásától és a sztatinok pleiotróp hatásával függhet össze.

VII/3. A thrombocyta-gátlószerek rezisztencia (clopidogrel rezisztencia) jelensége intrakoronáriás stent thrombózison átesett betegekben

A fentiek alapján az antithrombocita kezelés hatékonyságának mérésére klinikai igény van, az terápiás konzekvenciával jár. A rezisztens betegek identifikálása megkívánja az aggregációs labor saját standard értékeinek megállapítását (ld. VII/1. pont). Előző eredményeink alapján prospektíve identifikáltunk 10 olyan beteget, akiknél a standard terápia mellett részben restenosis, részben akut/subakut stent thrombosis miatt ismételt PCI-ra került sor és ADP EC₅₀ érték alapján terápia rezisztensnek bizonyultak. Ezt követően a betegek thrombocyta gátló terápiaja a következő algoritmus alkalmazásával került optimalizálásra:

150mg clopidogrel+ 100mg ASA; ezután 2x250 mg ticlopidin+100mg ASA; további ineffektivitás esetén 2x250 ticlopidin és 2x 200 mg dipyridamol+25 mg ASA. Az identifikált betegek a személyre szabott antithrombocytá kezeléssel reszponderré voltak tehetőek!

VII/4. A thrombocytá P2Y1 ADP receptor funkciójának analízise clopidogrel kezelt kardiovaszkuláris betegekben

A P2Y12 ADP receptor gátló clopidogrel a terápia kötelező eleme PCI-ra kerülő ischaemiás szívbetegben. Mivel a thrombocyták mindkét ADP receptorának (clopidogrel-target P2Y12 és a P2Y1) együttes aktiválódása hozza létre az aggregációt, cél a P2Y1 receptor egyéni variabilitásának és ezen receptor aggregációban játszott szerepének vizsgálata volt PCI-on átesett kettős antithrombocytá kezelésben részesülő betegekben (n=143). A P2Y1 receptor specifikus farmakológiai gátlása szignifikánsan csökkenti a thrombocytá aggregációt, jelezve, hogy ezen receptor – akár P2Y12 gátlással kombinálva – potenciális target lehet az antithrombocytá kezelésben. A P2Y1 receptor az ADP-induálta aggregáció elengedhetetlen résztvevője, mindazonáltal egyéni aktivitása nem határozza meg alapvetően a clopidogrel-kezelt betegek thrombocytá reaktivitását, annak elsődleges determinálója a P2Y12 receptor gátoltsági foka.

VII/5. Emelkedett plazma noradrenalin szint és trombocita P-szelektin, CD40 ligand pozitivitás összefüggése kettős trombocita gátló terápiaiban részesülő stabil koronária betegekben

A keringő catecholaminok szerepe szívelégtelenségben és ritmuszavarok területén jól ismert, azonban a trombociták adrenerg receptora révén fontos faktora lehet az atherothrombotikus folyamatoknak is. Mivel a szervezetben keringő catecholaminok 80%-a noradrenalin (NA), cél a NA szint és a trombocita reaktivitás összefüggésének vizsgálata volt olyan stabil koronária betegekben (n=21), akik másodlagos prevenciójuk során napi 100mg acetilszalícilsavat és 75mg clopidogrelt kaptak. A trombocita aktiválódást áramlási citometriával meghatározott P-szelektin illetve CD40 ligand pozitív trombociták arányával; az azonos időpontban levett plazmából a NA szintet kompetitív ELISA segítségével mértük. Kettős antitrombocita kezelésben részesülő stabil koronária betegekben magas plazma NA szint esetén a nagyobb a P-szelektin és a CD40L pozitív aktivált trombociták aránya. A keringő NA a trombocita adrenerg receptorán át az intracelluláris cAMP szint csökkentésével hoz létre aktivációt, ezért a gátlószerek mechanizmusait kikerülve trombocita hiperaktivitáshoz, aspirin és/vagy clopidogrel rezisztenciához és az atherothrombotikus kockázat emelkedéséhez vezet.

VII/6. Az aspirin in vivo és in vitro thrombocytá gátló hatásának vizsgálata

A kardiovaszkuláris betegek aspirin (ASA) kezelése a prevenció alapeleme. Cél olyan in vitro trombocytá aggregációs (TA) tesztek kidolgozása volt, melyek segítségével az aspirinhatás felmérhető, a rezisztens betegek rizikócsoportha sorolhatók. Az ASA szignifikánsan csökkenti az AA, kollagén és adrenalin indukálta aggregációt. In vitro ASA hozzáadása aspirinszedőkben parciális gátló hatású és magasabb reziduális aggregációt eredményez, ellentétben az aspirint nem szedőkben megfigyelhető kifejezett gátlással. A fenti aggregációs paraméterek alkalmazhatóak az ASA terápia utánkövetésére és a rezisztencia szűrésére. Az ASA szedőkben mérhető magas reziduális kollagén-indukálta TA utal az aspirin rezisztencia egyéni mértékére és jelzi a krónikus ASA terápia COX-1-független aggregációs mechanizmusokat aktiváló hatását.

A kutatócsoport által koordinált multicentrikus munka eredményeként 10 hazai műhely munkáját összefogva 2425 beteg trombocita aggregációs vizsgálatait elemeztük.

Megállapítottuk, hogy a másodlagos prevenció céljából acetilszalicilsavat (ASA) szedő betegek között 26,9%-ban fordult elő gyógyszerrezisztencia.

VII. A thrombocyta P2X1 receptor szerepe a haemostasisban

A leuveni egyetem kutatóival történő együttműködésnek köszönhetően egy nemzetközi és egy hazai publikáció jelenhetett meg a trombocita P2X1 purinerg receptor aktiválódását követő finomabb intracelluláris jelátviteli folyamatokat feltárva.